

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Vojtech Ličko

**Expres a aktivita potkaních cytochromů P450 3A po podání benzo[a]pyrenu
a Sudanu I**

*Expression and activity of rat cytochromes P450 3A after exposure to benzo[a]pyrene
and Sudan I*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Helena Dračínská, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Heleny Dračínské, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne:

Podpis:

Poděkování

Veľmi rád by som sa touto cestou poďakoval svojej školiteľke RNDr. Helene Dračínskej Ph.D. za jej ochotu, trpezlivosť, čas a cenné rady, ktoré mi počas práce venovala. Ďalej by som sa tiež rád poďakoval Sandre Jelínkovej, Zuzane Klusoňovej a Janu Královi za ich praktické rady a spríjemnenie času v laboratóriu.

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce je studium vlivu kancerogenů benzo[*a*]pyrenu a Sudanu I podávaných laboratorním potkanům samostatně nebo společně na expresi a aktivitu významného biotransformačního enzymu cytochromu P450 podrodiny 3A v játrech – hlavním orgánu metabolismu xenobiotik, ve kterém je obsah CYP3A zvlášť vysoký.

Pomocí metody kvantitativní PCR jsme pozorovaly pokles exprese genů *CYP3A* v játrech laboratorních potkanů nepremedikovaných a premedikovaných benzo[*a*]pyrenem, Sudanem I a jejich kombinacemi. Metodou Western Blot s následnou imunodetekcí jsme i na proteinové úrovni pozorovaly podobnou tendenci poklesu exprese CYP3A v játrech potkanů vystavených samostatně podanému benzo[*a*]pyrenu a Sudanu I. Specifická aktivita CYP3A, stanovená markerovou reakcí CYP3A, kterou je 6 β -hydroxylace testosteronu, však předchozí výsledky potvrzuje jen u některých skupin premedikovaných potkanů.

Celkově lze shrnout, že vystavení laboratorních potkanů oběma studovaným látkám s kancerogenním potenciálem vedlo k poklesu exprese jaterních CYP3A *in vivo*.

Klíčová slova: cytochromy P450, benzo[*a*]pyren, Sudan I, exprese, enzymová aktivita

ABSTRACT

The aim of this Bachelor thesis is the study of the effect of two carcinogenic compounds, benzo[*a*]pyrene and Sudan I, co-administered to rats individually or in combination, on the expression and the activity of important biotransformation enzymes cytochromes P450 of subfamily 3A in liver – a main organ of xenobiotic metabolism, in which the amount of CYP3A is especially high.

Using the quantitative PCR method, the decrease of the gene expression of *CYP3A1/2* in the livers of rats exposed to benzo[*a*]pyrene and Sudan I individually or in combination, was observed. Using the Western Blot method with a consecutive immunodetection, we found the decrease of the protein expression of CYP3A in the livers of rats treated with benzo[*a*]pyrene and Sudan I alone. Specific activity of CYP3A, determined by marker reaction of CYP3A, which is 6 β -hydroxylation of testosterone, did endorse the previous results only in some of the premedicated groups of rats.

It can be concluded that the exposure of rats to both studied compounds with carcinogenic potential resulted in a decrease in the expression of hepatic CYP3A *in vivo*.

(In Czech)

Keywords: cytochromes P450, benzo[*a*]pyrene, Sudan I, expression, enzyme activity

OBSAH

1	Úvod.....	10
1.1	Karcinogeny	10
1.1.1	Azobarviva	11
1.1.1.1	Sudan I.....	12
1.1.1.2	Metabolismus Sudanu I	12
1.1.2	Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	14
1.1.2.1	Benzo[a]pyren.....	15
1.1.2.2	Metabolismus benzo[a]pyrenu	16
1.2	Biotransformace xenobiotik	18
1.2.1	První fáze biotransformace.....	18
1.2.2	Druhá fáze biotransformace	19
1.3	Cytochromy P450	19
1.3.1	Podrodina CYP3A	20
1.3.2	Inducibilita CYP3A	21
2	Cíl práce	23
3	Materiály a metody	24
3.1	Použité chemikálie.....	24
3.2	Použité přístroje	25
3.3	Premedikace potkanů a izolace mikrosomů	27
3.4	Stanovení relativní genové exprese cytochromů P450 <i>3A1</i> , <i>3A2</i>	27
3.4.1	Stanovení koncentrace a čistoty izolované RNA	27
3.4.2	Syntéza cDNA reversní transkripcí	28
3.4.3	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR).....	29
3.4.4	Analýza dat qPCR.....	31
3.5	Stanovení proteinové exprese CYP3A.....	32
3.5.1	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)	32
3.5.2	Metoda Western Blot a imunodetekce	33
3.6	Stanovení enzymové aktivity CYP3A	34
3.6.1	Příprava inkubačních směsí.....	34
3.6.2	Stanovení 6β-OH-testosteronu pomocí HPLC	35
4	Výsledky	36

4.1	Stanovení koncentrace izolované RNA	36
4.1	Genová exprese <i>CYP3A1/2</i>	37
4.2	Proteinová exprese CYP3A.....	39
4.3	Stanovení aktivity CYP3A	40
5	Diskuze.....	41
6	Závěr	44
7	Seznam použité literatury.....	45

Seznam použitých zkratek

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky, z angl. „aryl hydrocarbon receptor“
ALP	alkalická fosfatasa
APS	persíran amonný
BaP	benzo[<i>a</i>]pyren
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
CAR	konstitutivní androstanový receptor z angl. „constitutive androstan receptor“
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CYP	cytochrom P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie z angl. „high pressure liquid chromatography“
IARC	mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (z angl. International Agency for Research on Cancer)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBT	nitrobluetetrazolium
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCR	polymerázová řetězová reakce z angl. Polymerase chain reaction“
PVDF	polyvinylidenfluorid
PXR	pregnanový receptor X z angl. Pregnan X receptor
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	otáčky za minutu, z angl. „revolutions per minute“
RT	reverzní transkripce
SDS	dodecylsulfát sodný
Sud I	Sudan I

SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
TEMED	tetramethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 ÚVOD

Vědecký pokrok za posledních 150 let je nezpochybnitelný. Zejména na poli medicíny se díky němu lidstvo zbavilo většiny onemocnění. To sebou nese zvýšení průměrné délky života člověka. S opomenutím chudých světových regionů můžeme říci, že jedním z nejčastějších příčin úmrtí se staly právě nádorová onemocnění [1].

Onkologická onemocnění představovaly v moderní medicíně vždy jednu z největších překážek při úspěšném udržování kvality lidského života a zdraví. Pokles úmrtnosti v případě těchto onemocnění byl v posledních dekáдах dosažen díky včasné a účinné diagnóze, která by bez rigorózního studia chemických látek způsobujících nádorové bujení nebyla možná. Typickými zástupci těchto látek, nazývaných karcinogeny, jsou právě námi studované polutanty – benzo[*a*]pyren a Sudan I. Metabolické reakce všech organismů mají za důsledek širokospektrální a komplexní modifikace těchto polutantů. Jednotlivé metabolity pak mají různý karcinogenní potenciál.

Celosvětové protikuřácké kampaně mají velký zájem o studium karcinogenity benzo[*a*]pyrenu, protože je mimo jiné součástí cigaretového kouře [2]. Sudan I je barvivo, které bylo využíváno v oblasti potravinářského průmyslu. Karcinogenní toxicita takové sloučeniny se pak stává agendou kontrolních úřadů [3]. I proto studium těchto dvou organických látek má v moderní společnosti značný význam.

1.1 KARCINOGENY

Karcinogen je látka vyvolávající rakovinu. Kancerogenních látek je známo mnoho. Jde o různé chemické sloučeniny i v ovzduší nebo půdě přirozeně se vyskytující, ale zejména v rámci průmyslové výroby produkované. K nim patří například polycyklické aromatické uhlovodíky, vznikající v cigaretovém kouři a při spalování [4] [5].

Při karcinogenezi se uplatňují různé vnitřní a vnější faktory, z nichž vnější značně převažují. Jedná se hlavně o kouření tabákových výrobků nebo nadměrnou konzumaci alkoholu. V případě vnitřních faktorů kancerogeneze je směrodatný například věk organismu [6]. Karcinogeneze je mnohastupňový proces, při němž dochází ke kumulaci

mutací určitých genů, vedoucích k porušení normální funkce jimi kódovaných proteinů [7]. Nejvýznamnější jsou poruchy genů kódující proteiny podílející se na přenosu signálu, kontrole exprese genů, kontrole správnosti replikace DNA, regulaci buněčného cyklu, dělení a diferenciaci buněk, mezibuněčné komunikace a apoptózy poškozených nebo nesprávně diferenciovanych buněk. Zvýšená expozice karcinogenním činitelům koreluje se zvýšeným počtem poruch DNA, a tím i s větším rizikem vzniku onkologického onemocnění [8].

Karcinogenní látky jsou látky zpravidla schopny přímo nebo po metabolické přeměně vytvářet adukty s DNA, případně jejich metabolismem vznikají volné kyslíkové radikály reagující s DNA. Vznik DNA aduktů v množství $\sim 1/10^5$ až $1/10^6$ nukleotidů účinkem určitých sloučenin je silně mutagenní a karcinogenní. Do lidského těla se mohou dostat potravou, pitnou vodou, dýcháním i přes kůži [8].

Látky dělíme dle míry jejich karcinogenity do několik kategorií: Kategorie 1 - Látka je karcinogenní pro člověka; Kategorie 2A – Látka je pravděpodobně karcinogenní pro člověka; Kategorie 2B – Látka je podezřelá z karcinogenity pro člověka; Kategorie 3 – Látka není klasifikována jako karcinogen pro člověka; Kategorie 4 – Látka pravděpodobně není karcinogenní pro člověka [9].

Je třeba brát zřetel na to, že zařazení látky do třetí kategorie neznamená prohlášení látky za bezpečnou nebo nekarcinogenní. Ve skutečnosti označení třetí kategorie jen naznačuje, že je potřebný další výzkum, zvláště v případě rozšířené expozice populace k takové látce [9].

1.1.1 Azobarviva

Azosloučeniny jsou reprezentovány vzorcem $R-N=N-R'$, kde $-N=N-$ je azo skupina a R nebo R' jsou arylový nebo alkylový zbytek. Slovo azo pochází ze slova azote, francouzského názvu dusíku odvozeného z řeckého α - (a-, "ne") + $\zeta\omega\eta$ (zōē, "žít") [10].

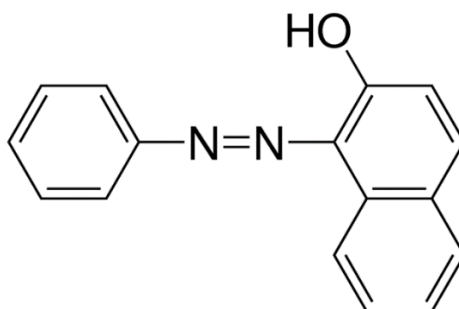
V střevní nebo kožní mikroflóře probíhá redukční štěpení azobarviv (azo redukce). Touto biotransformací vznikají aromatické aminy, které vykazují kancerogenní účinky, přičemž přímo karcinogenní azobarviva už byla také zaregistrována. Nekontrolovaný únik těchto barviv do odpadu představuje obrovskou hrozbu pro lidské

zdraví a životní prostředí. K takovým únikům dochází zejména v rámci textilního průmyslu [10] [11].

1.1.1.1 Sudan I

Sudan I je důležitým zástupcem sudanových barviv, které se využívali při barvení mj. textilních výrobků nebo dokonce potravin. Součástí jeho chemické struktury (Obrázek 1) je funkční skupina -N=N-, která ho řadí do skupiny azosloučenin [12]. Podle IARC spadá do 3. kategorie karcinogenů – „not classifiable as to its carcinogenicity to humans“, neboli „neklasifikovaný jako karcinogen pro člověka“. V rámci Evropské unie je užití Sudanu I v potravinářství zakázáno [13]. Navzdory tomuto faktu se ale v posledních dvou dekáдах vyskytlo několik případů, při kterých byl Sudan I nalezen v potravinách importovaných z krajín mimo Evropské unie [14].

Sudan I má mutagenní účinek na bakteriální i savčí buňky. Genotoxicita byla prokázána po metabolické aktivaci jaterními cytochromy P450 (CYP) a peroxidasami *in vitro* a u laboratorních potkanů, myši a králíků v játrech a močovém měchýři *in vivo* [14].



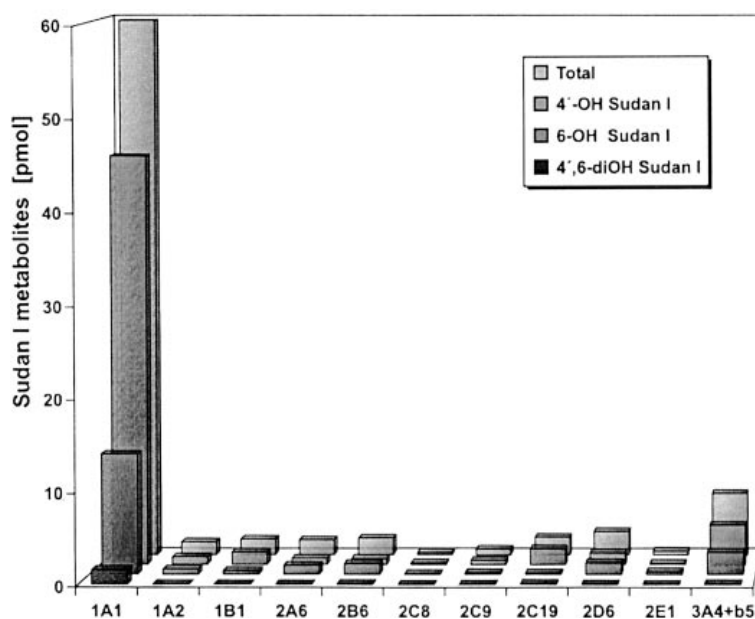
Obrázek 1: Struktura Sudanu I

1.1.1.2 Metabolismus Sudanu I

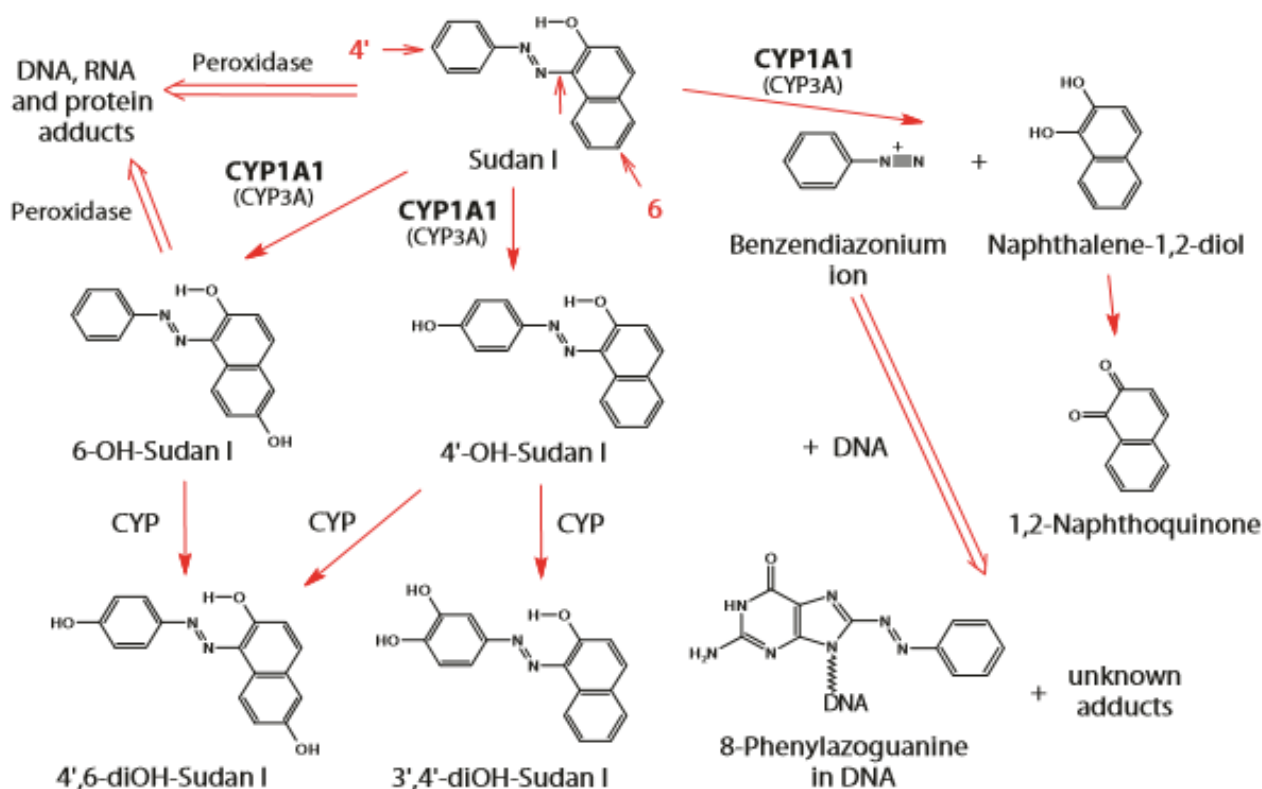
Metabolismus Sudanu I u potkanů a králíků probíhá především v játrech pomocí oxidačních a redukčních reakcí. Majoritně probíhá reakcemi katalyzovanými enzymem CYP1A1. U lidí dochází k přeměně Sudanu I také oxidací katalyzovanou v játrech převážně CYP1A1. Minoritní roli v biotransformaci CYP hraje nicméně i CYP3A4 (Obrázek 2, str. 13) [9] [11].

CYP1A1 a CYP3A králíků a potkanů katalyzují C-hydroxylaci Sudanu I v poloze 4' benzénového kruhu, čímž vzniká 1-[(4'-hydroxyfenyl)azo]-2-naftol. Hydroxylaci

v poloze 6 vzniká 1-(fenylazo)naftalen-2,6-diol a další hydroxylaci pak 1-(4'-fenylazo)-naftalen-2,6-diol (4',6-diOH-Sudan I). U potkanů byl detekován minoritní metabolit 1-(3,4'-dihydroxyfenylazo)-2-naftol (3,4'-diOH-Sudan I) jako produkt oxidace jaterními mikrosomy. Působením CYP1A1 a CYP3A dochází také k toxické aktivaci oxidačním štěpením azoskupiny Sudanu I. Produktem takové reakce je benzediazoniový ion, vytvářející 8-(fenylazo)guaninový adukt s DNA (Obrázek 3, str. 14) [12] [15].



Obrázek 2: Oxidace Sudanu I na hydroxylované metabolity lidskými rekombinantními cytochromy P450. Experimenty byly provedeny s 25 pmol lidských rekombinantních CYP na inkubaci 100 μ M Sudanu I. Převzato z [16].



Obrázek 3: Schéma metabolismu Sudanu I. Převzato z [12].

1.1.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou organické sloučeniny, jejichž chemická struktura je obecně tvořená třemi nebo více kondenzovanými benzenovými jádry (Obrázek 4, str.16). Vznikají při neúplném spalování [17] nebo vysokotlakých procesech. I když PAU vznikají rovněž přirozenou cestou při lesních požárech nebo vulkanických činnostech, většina jejich zastoupení v ovzduší pochází z lidské činnosti v rámci průmyslné výroby. Mezi takové procesy patří zejména spalování dřeva, uhlí, fosilních paliv, pneumatik, polypropylénu a polystyrénu a produkce koksu. V atmosféře je pak osud PAU ovlivněn zejména jejich molekulární hmotností. Těžší PAU (více než 4 aromatické kruhy) mají tendenci adsorbovat na různé nosiče. Lehčí PAU (méně než 4 aromatické kruhy) jsou více těkavé a vyskytují se primárně v plynné fázi. Koncentrace těchto xenobiotik ve vodě je přibližně 100 ng/L. Takto nízká koncentrace je důsledkem jejich hydrofobního charakteru. V ovzduší, půdě, jídle a vodě pak nacházíme přibližně 100 různých PAU [18] [19].

PAU mají nízký stupeň akutní toxicity pro člověka. Nejzávažnější důsledek jejich toxicity je kancerogenese. To dokazují statistiky ukazující zvýšený počet případů rakoviny plic, kůže nebo močového měchýře spojených s pravidelnou pracovní expozicí těmto látkám [18].

Vstup těchto xenobiotik do organismu probíhá požitím, inhalací nebo transdermálně. Jejich biodostupnost pak závisí mj. na nosiči (transportním médiu), na kterém jsou při styku s organismem vázány. Osud PAU v organismu člověka je různorodý, a tak je předmětem mnoha studií. Obecně jsou PAU metabolizovány v mnoha orgánech a vylučovány v žluči, v moči nebo v mateřském mléku. Částečně může také docházet k ukládání PAU do tukových tkání [18].

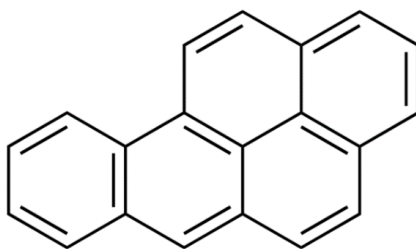
1.1.2.1 Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren (Obrázek 4, str.16) je krystalický, aromatický uhlovodík, jehož struktura je složena z pěti benzenových jader. Primárně se uvolňuje při spalování pohonných hmot. Obsažen je také v cigaretovém kouři. Tento polutant se kovalentně váže na DNA, čím vytváří mutace. Podle IARC spadá do první kategorie karcinogenů – „látko je karcinogenní pro člověka“ [20].

Po vstupu do organismu je benzo[a]pyren (BaP) distribuován do jater, ledvin, močového měchýře a k částečnému průniku dochází také přes placentu. V rámci těchto orgánů je bioaktivace jaterními enzymy nejvýznamnější. Lipofilní charakter tohoto xenobiotika také umožňuje akumulaci v tukových tkáních [21].

Mezi hlavní toxické účinky BaP patří mutace, a tedy kancerogenese. Mezi nejčastější onkologické onemocnění vyvolané BaP řadíme zejména karcinom plic, močového měchýře a děložního čípku. Na biotransformaci BaP se primárně podílejí

žaterní enzymy z rodiny cytochromů P450. BaP zde působí jako induktor některých izoform CYP, čímž zvyšuje riziko toxické aktivace [21].



Obrázek 4: Struktura BaP

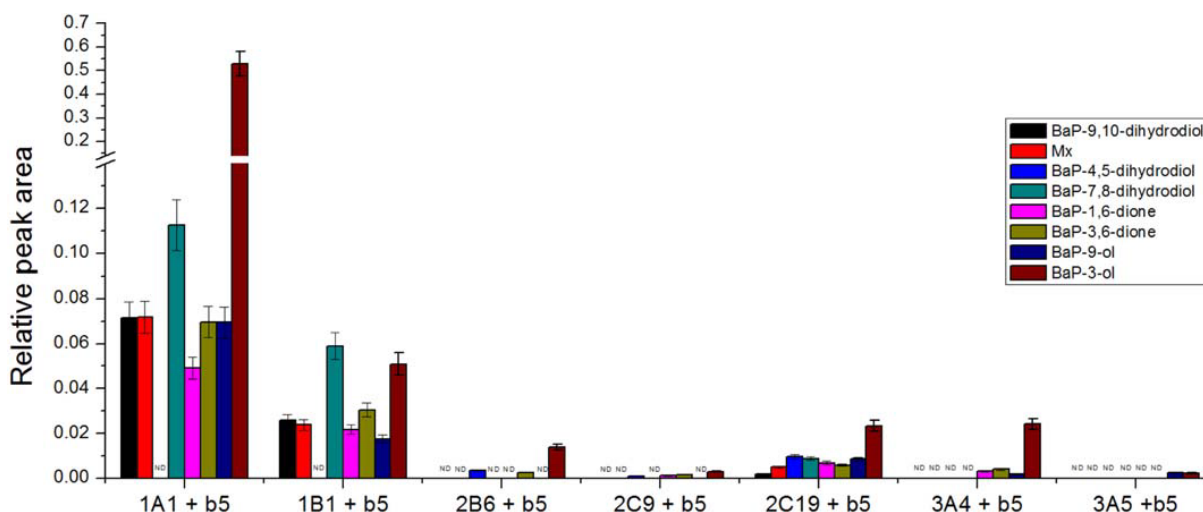
Výsledky experimentu z Číny poskytují jeden z mnoha důkazů kancerogenního potenciálu BaP. Tento experiment byl proveden na 120 laboratorních myších rozdělených do 5 stejně početních skupin. Skupiny byly premedikovány intraperitoneálně DMSO (kontrola), antracénem (50 mg/kg), BaP (10 mg/kg), BaP (20 mg/kg) a benzo-[G, H, I]-perylénem (5 mg/kg). Nejvyšší výskyt nádorů vykazovala skupina premedikovaná BaP (20 mg/kg). Zbytek jedinců ze stejné skupiny obsahoval prekancerózní tkanivo [22].

Dopad přímo na lidskou společnost dokládá například studie z Francie, ve které byli pozorováni pracovníci obsluhující koksové pece. Množství PAU v organismu jednoho pracovníka bylo v této studii stanoveno měřením obsahu 1-hydroxypyrénu (1-OHP) v moči. Vystavení konkrétně k BaP bylo provedeno analýzou BaP aduktu (BPDE) s DNA (viz. kapitola 2.1.2.2) v leukocytech. Výsledky pak ukazovaly korelaci mezi zvýšenými hodnotami 1-OHP v moči a DNA adukty v leukocytech. Tyto hodnoty se rovněž signifikantně lišily od hodnot z kontrolních vzorků [23].

1.1.2.2 *Metabolismus benzo[a]pyrenu*

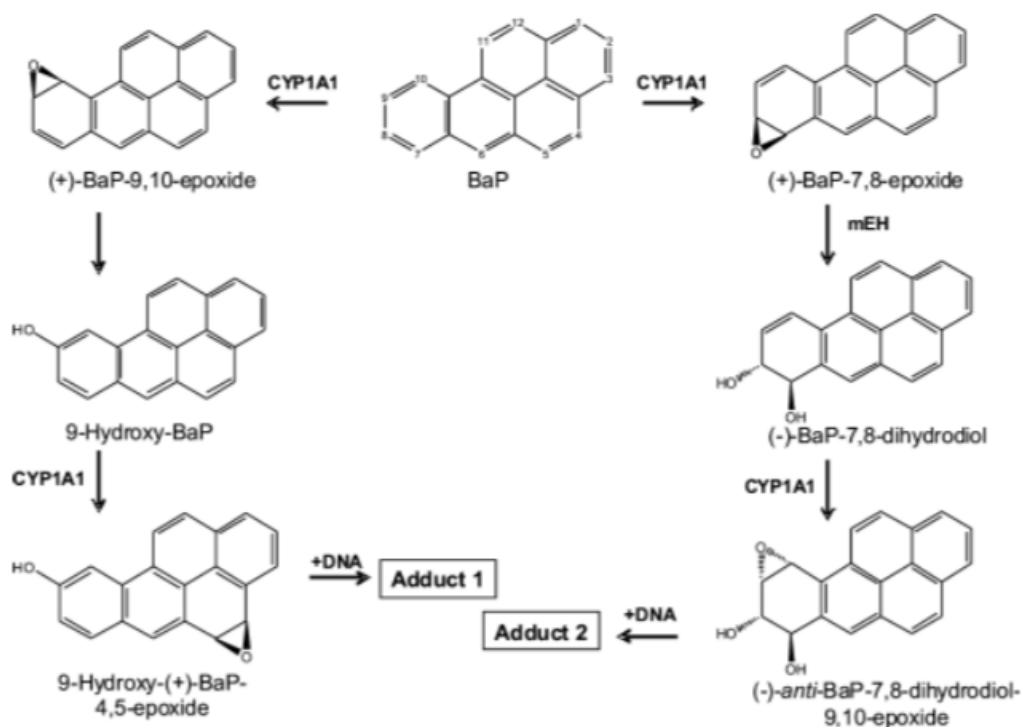
Benzo[a]pyren je prokarcinogen, který je v rámci redoxních reakcí metabolismu aktivován na karcinogen. Tato biotransformace vede k tvorbě hydroxylovaných meziproduktů epoxidů, chinonů a dihydrodiolů. Mezi produkty reakcí katalyzovaných žaterními enzymy u potkanů *in vivo* a u lidí *in vitro* byly identifikovány mimo jiné metabolity jako BaP-7,8-dihydrodiol, BaP-9-ol a BaP-3-ol. Metabolismus probíhá majoritně reakcemi katalyzovanými CYP1A1 [24]. Produkty katalýzy se v rámci jednotlivých podrodin cytochromů různí [25]. U lidí pak CYP3A4 bioaktivují BaP

zejména za vzniku metabolitu BaP-3-ol, který je považován za detoxikační metabolit BaP (Obrázek 5) [26].



Obrázek 5: Tvorba BaP metabolitů lidskými CYP exprimovanými v supersomech (mikrosomy izolované z hmyzích buněk transfekovaných konstruktem baculoviru obsahujícího cDNA lidských CYP) v přítomnosti cytochromu b5. Zobrazená data jsou průměry a standardní odchylky z tří nezávislých měření. Převzato z [26].

Vedle přímé oxidace BaP na BaP-7,8-epoxid, katalyzuje potkaní CYP1A1 epoxidační reakci, jejíž substrátem je BaP-7,8-dihydrodiol. Vzniká metabolit BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) [24]. Ten vytváří adukty především s purinovými bázemi DNA. Vzniká tak 10-(deoxyguanosin-N2-yl)-7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyren. BaP může být také oxidován na BaP-9,10-epoxid a dále na 9-hydroxy-BaP-4,5-epoxid, který rovněž vytváří s DNA kovalentní adukty (Obrázek 6, str.18) [25].



Obrázek 6: Metabolická aktivace BaP, převzato z [25].

1.2 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK

Biotransformace je biochemický proces, kterým dochází k eliminaci cizorodých látek z organismu. Tento proces je katalyzován enzymy převážně v játrech, plicích, ledvinách, střevech, kůži ale i dalších tkáních. Během evoluce se u jednotlivých organismů vyvinulo mnoho detoxikačních mechanismů. Eliminace xenobiotik z organismu je velmi podstatný proces plnící úlohu reakce na chemické podněty prostředí. Při nadměrném nebo chronickém působení toxické látky totiž dochází k nevratnému poškození organismu. Proto je eliminace xenobiotik pro zachování jedince nezbytná. U eukaryotických organismů se rozlišují dvě hlavní fáze eliminace xenobiotik [27].

1.2.1 První fáze biotransformace

První fáze, někdy také nazývána derivatizační, bývá katalyzována zejména cytochromy P450, monooxygenasami, dioxygenasami, peroxidasami, fosfatasami nebo jinými hydrolasami. Jim odpovídající chemické reakce jsou například oxidace, hydroxylace, deaminace, epoxidace, sulfoxidace, redukce a hydrolýza. Těmito

modifikacemi dochází ke zvýšení hydrofility xenobiotika, a tím zvýšení schopnosti účastnit se druhé fáze biotransformace [27] [28] [29].

1.2.2 Druhá fáze biotransformace

Druhá fáze, konjugace, bývá katalyzována zejména enzymy z třídy transferas. Při těchto reakcích dochází ke konjugaci exogenní látky (xenobiotika) s látkou endogenní. K vazbě dochází přes příslušnou, nejčastěji amino- nebo hydroxy-, skupinu. Výsledný konjugát má pak výraznější hydrofilní charakter. Tímto způsobem vytváří konjugáty s xenobiotiky například sacharidy, glukuronát, glutathion, taurin nebo glycin [27] [28].

1.3 CYTOCHROMY P450

Cytochromy P450 jsou hemoproteiny hrající významnou roli v metabolismu xenobiotik, v rámci již zmíněných biotransformačních reakcí. K metabolismu exogenních látek dochází na mnoha místech organismu včetně jater, stěny tenkého střeva, plic, ledvin a plasmy. Hlavní místo metabolismu jsou játra. Jejich funkce je detoxikace a usnadnění exkrece xenobiotik. Cytochromy P450 toho v jaterních buňkách dosahují enzymatickou konverzí látek lipofilních na látky víc rozpustné ve vodném prostředí. K této konverzi dochází převážně pomocí oxidace - reakce první fáze biotransformace xenobiotik. Funkce této široké skupiny enzymů je rovněž důležitá při objasňování vzájemných interakcí xenobiotik v organismu [30] [31].

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách, které jsou řazeny do genetických rodin a podrodin. Toto řazení je stanoveno dle míry homologie jejich primární struktury proteinových molekul. Na tomto základu jsou děleny do rodin, které označují příslušná čísla (např. CYP1, CYP2) a pak do podrodin, které označují příslušná písmena (např. CYP1A, CYP2D). Jednotlivé isoformy v rámci jedné podrodiny se značí číslem na třetím místě (např. CYP1A1, CYP2D6) [30].

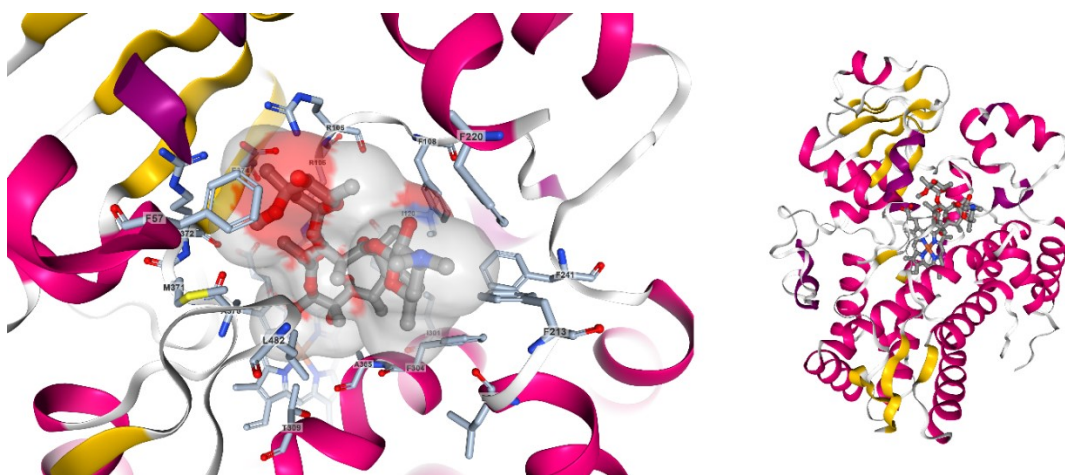
Označení P450 vzniklo z faktu, že redukovaný cytochrom v komplexu s CO vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 450 nm. Písmeno P je pak zkratka pro „pigment“ [25] [26].

1.3.1 Podrodina CYP3A

Enzymy CYP3A katalyzují metabolismus velkého množství endogenních a exogenních látek, např.: hormonu testosteronu, imunosupresiva cyklosporinu A, antihistaminika terfenadinu, antikonvulziva mephenytoinu a antikoagulantu warfarinu. Lidský CYP3A4 metabolizuje více než 50% známých terapeutických látek [34]. Tyto enzymy patří mezi inducibilní enzymy. Jsou indukovány např. kortikosteroidem dexamethasonem nebo antibiotikem erytromycinem [35] [36].

U potkanů jsou známy v rámci této podrodiny izoformy 3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23 a 3A62. Izoformy 3A1 a 3A2 sdílejí 89 % sekvence aminokyselin a detekovány byly v játrech. Mezi jejich typické reakce patří hydroxylace (např. 6 β -hydroxylace testosteronu) [35] [36] [37].

Podrodina CYP3A je nejvýznamnějším zástupcem exprimovaných CYP v lidských játrech (až 30% všech jaterních CYP proteinů). Lidské *CYP3A* geny se nacházejí v místě q27.1 na chromozomu 7. Velikost jeho genu je 26.5 kb. Z hlediska kancerogeneze jsou důležitými substráty tohoto enzymu karcinogenní xenobiotika, jako jsou některé přírodní produkty (aflatoxiny), polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a z endogenních látek pak steroidní sloučeniny (17 β -estradiol, testosteron, progesteron, kortisol). Typickým substrátem enzymu CYP3A je antibiotikum erytromycin (Obrázek 7). [34] [38] [39].



Obrázek 7: Krystalická struktura lidského CYP3A4 v komplexu s erytromycinem. Vlevo detail na aktivní centrum enzymu, v kterého pozadí můžeme pozorovat inkorporovaný, porfyrinový skelet. Převzato a upraveno z [40].

1.3.2 Inducibilita *CYP3A*

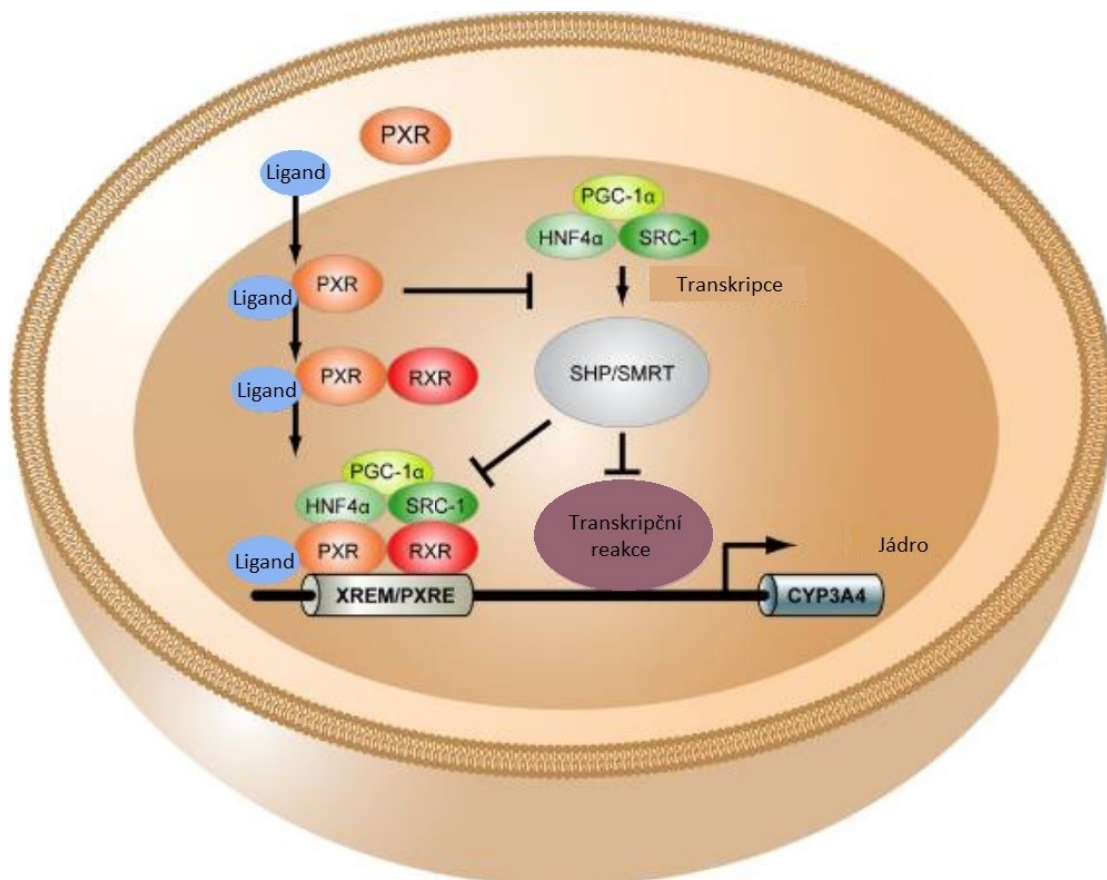
Expresi *CYP3A* může být indukována různými xenobiotiky. Taková indukce může zároveň vést k zvýšenému metabolismu těchto samotných xenobiotik. Tento fenomén se nazývá autoindukce. Mnoho xenobiotik indukuje expresi *CYP3A* přes pregnanový X receptor (PXR) [41] [42], zatímco u jiných se předpokládá účinek přes konstitutivní androstanový receptor (CAR) a receptor pro vitamín D (VDR) [34].

PXR je indukován velkým množstvím endogenních a exogenních látek [41]. Mezi endogenní patří steroidní látky jako například $1\alpha,25$ -dihydroxy vitamín D3 nebo lithocholová kyselina. Mezi xenobiotika patří antibiotikum rifampicin nebo antikonvulzivum fenobarbital [34].

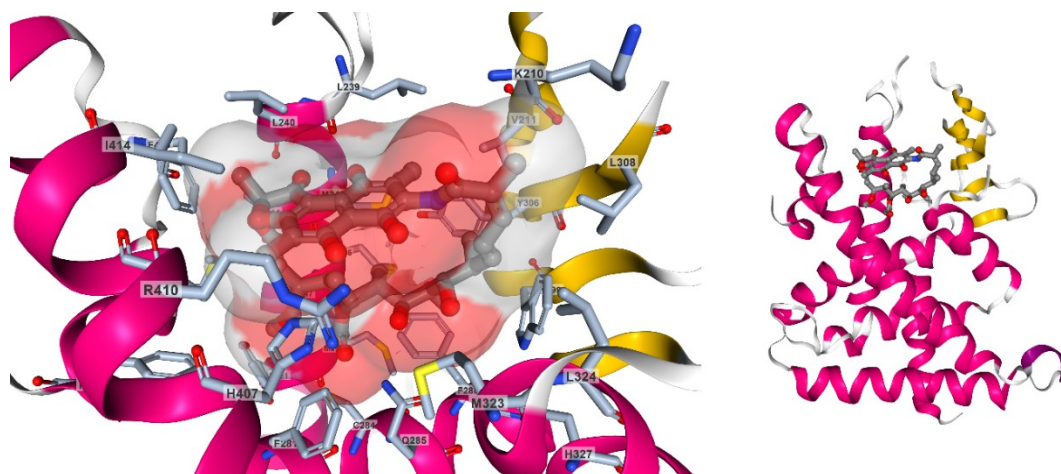
Indukce *CYP3A4* probíhá procesem znázorněným na obrázku 8 (str. 22). Vazbou ligandu aktivovaný PXR vytváří heterodimér s RXR (retinoid X receptor). Následně dochází ke stabilizaci tvorbou komplexu s koaktivátory SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), HNF4 α (hepatocyte nuclear factor α) a PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α). Tento komplex rozeznává úseky AG(G/T)TCA v promotorové oblasti genu *CYP3A4*. Jednou z nich je XREM (xenobiotic responsive enhancer module) nacházející se v oblasti od -7836 do -7607 bp nebo PXRE (PXR responsive element) nacházející se v oblasti od -179 do -35 bp. Takto vázaný transkripční faktor umožňuje následnou transkripci genu. V případě absence PXR aktivovaného ligandem umožňují koaktivátory transkripci jiných nukleárních receptorů SHP (small heterodimer partner) nebo SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors). Ty v konečném důsledku způsobí inhibici transkripce *CYP3A4* [34] [43].

Lidský PXR, podobně jako ostatní nukleární receptory, obsahuje doménu vázající DNA charakterizovanou dvěma “zinc finger“ supersekundárními strukturami typu 4C – obsahující čtyři cysteinové zbytky umístěné v rozmezí od 41 do 107 aminokyselinových zbytků. Doména vázající ligand (LBD) je umístěna v rozmezí od 141 do 434 aminokyselinových zbytků. LBD lidského PXR obsahuje velké, flexibilní a vysoce hydrofobní vazebné místo přizpůsobivé pro strukturně diverzní molekuly a umožňuje tak

vazbu v mnoha orientacích (Obrázek 9). To je důvod indukce *CYP3A4* celou škálou různých xenobiotik [34].



Obrázek 8: Diagram znázorňující aktivaci PXR a indukci *CYP3A4*. Detailní popis v kap. 1.3.2. Převzato a upraveno z [43]



Obrázek 9: Krystalická struktura lidského PXR v komplexu s rifampicinem. Vlevo detail na hydrofobní vazebné místo. Převzato a upraveno z [44].

2 CÍL PRÁCE

Bakalářská práce byla součástí projektu Laboratoře molekulární karcinogenese a vývoje léčiv, zabývajícího se vlivem zvýšené exprese vybraných biotransformačních enzymů na genotoxicitu benzo[*a*]pyrenu a Sudanu I *in vivo*. V rámci projektu bylo potřeba stanovit případné změny v expresi a aktivitě biotransformačních enzymů v játrech laboratorního potkana vyvolané samostatným nebo společným působením Sudanu I a BaP.

Úkolem této bakalářské práce je studium vlivu BaP a Sudanu I podávaných laboratorním potkanům samostatně nebo ve vzájemné kombinaci na proteinovou a genovou expresi a aktivitu CYP3A. V rámci předkládané bakalářské práce byla sledována genová exprese, množství a aktivita CYP3A *in vivo* v játrech potkanů po expozici BaP, Sudanu I nebo jejich kombinací a potkanů kontrolních, nevystavěných žádné z uvedených látek.

Hlavní cíle bakalářské práce:

Reverzní transkripce převést izolovanou RNA na cDNA.

Metodou kvantitativní PCR porovnat genovou expresi *CYP3A1/2* v játrech laboratorních potkanů nepremedikovaných a premedikovaných BaP, Sudanem I a jejich kombinacemi.

Metodou Western Blot s následnou imunodetekcí porovnat množství CYP3A přítomné v játrech potkanů nepremedikovaných a premedikovaných BaP, Sudanem I a jejich kombinacemi.

Stanovit specifickou aktivitu CYP3A v jaterních mikrosomálních frakcích získaných ze všech premedikačních skupin laboratorních potkanů.

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

BIO-RAD, USA: APS, TEMED

BD Gentest™, USA: potkaní rekombinantní cytochrom P450 3A1 a 3A2 v Supersomech™

Cayman Chemical, USA: 6β-hydroxytestosteron

Fluka, Švýcarsko: akrylamid, bisakrylamid, testosteron

J.T. Baker, USA: methanol (pro HPLC)

Lachema/Lach-Ner, ČR: glycín, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, glycerol, KH_2PO_4 , kyselina octová, methanol, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, bromfenolová modř

Laktino, ČR: sušené mléko

Loba-Chemie, Indie: Ponceau barva

Penta, ČR: ethanol, NaCl, Na_2HPO_4

Promega Corporation, USA: BCIP, NBT

Roche, Švýcarsko: FastStart Essential DNA Probes Master

Serva, USA: akrylamid, bisakrylamid, dodecylsírán sodný (SDS), N,N,N',N'-tetraethylendiamin (TEMED), Coomassie Brilliant Blue R 250, Triton X-100

Sigma-Aldrich, USA: králičí protilátka proti GAPDH, králičí protilátka proti CYP3A1/2, kozí protilátka proti králičímu IgG značená alkalickou fosfatase, fenacetin, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, NADP^+ , NADPH, Precision Plus Protein Dual Color Standards, SDS

Thermo Scientific, USA: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, PVDF membrána, TaqMan sondy pro CYP 3A1, 3A2, β-aktin

3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Inkubátory

Mini Dry Bath Incubator, MIULAB, Čína

Analytické váhy

40 SM-200 A Pesa, Švýcarsko

Automatické pipety

Eppendorf, Německo

Nichipet EX America, Japonsko

Centrifugy

Centrifuga EBA 270 Hettich, výkyvný rotor Hettich, Německo

SpectrafugeTM, Mini centrifuga Labnet, Japonsko

Inkubátory

Thermomixer Compact Eppendorf , Německo

Mini Dry Bath Incubator MIULAB, Čína

Magnetické míchačky

KMO 2 Basic IKA, Německo

Předvážky:

KERN EW 600-2M Kern & Sohn GmbH, Německo

Přístroj pro přenos proteinů na membránu Biometra, Německo

Spektrofotometry:

Helios α

Systém HPLC:

AGILENT 1260 Infinity

Termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

Předkolona: Nucleosil 100-5 C18

Kolona: Nucleosil 100-5 C18 - 250/4 Macherey-Nagel

Vakuová odparka:

CentriVap Benchtop vakuum concentrator LABCONCO, USA

Vortex:

Vortex 3 genius IKA, Německo

MS1 minishaker IKA, Německo

VX-200 Lab Vortexer LABNET, USA

Zdroje napětí:

PowerPac™ Basic Power Supply BIO RAD, USA

Electrophoresis Power Supply-EPS 301 Amersham Pharmacia Biotech, USA

3.3 PREMEDIKACE POTKANŮ A IZOLACE MIKROSOMŮ

Potkani kmene Wistar byli vystaveni účinku azobarviva Sudanu I, které bylo podáváno intraperitoneálně, benzo[*a*]pyrenu podávanému žaludeční sondou, a jejich kombinacím (Tabulka 1). Obě látky byly rozpuštěny v potravinářském slunečnicovém oleji. V každé premedikační skupině byli tři laboratorní potkani. Dávkování Sudanu I odpovídalo 50 mg/kg váhy potkana a benzo[*a*]pyrenu 150 mg/kg váhy potkana. Třetí den byla zvířata usmrcena a byly z nich odebrány orgány, které byly ihned zamrazeny v tekutém dusíku a uchovány při teplotě -80°C.

Tabulka 1: Schéma aplikace látek laboratorním potkanům.

Skupina	Premedikace	První den	Druhý den
Sud I	Sudan I	Olej	Sud I
BaP	Benzo[<i>a</i>]pyren	Olej	BaP
Sud I + BaP	Sudan I + Benzo[<i>a</i>]pyren	Sud I	BaP
BaP + Sud I	Benzo[<i>a</i>]pyren + Sudan I	BaP	Sud I
CTRL	Kontrola	Olej	Olej

Izolace mikrosomů a RNA byla uskutečněna ze spojených jater potkanů patřících do jednotlivých premedikačních skupin [45]. Tato experimentální část nebyla prováděna v rámci této bakalářské práce, pro kterou byly výchozím materiálem jaterní mikrosomy a RNA.

3.4 STANOVENÍ RELATIVNÍ GENOVÉ EXPRESE CYTOCHROMŮ P450 3A1, 3A2

3.4.1 Stanovení koncentrace a čistoty izolované RNA

Pro stanovení čistoty a koncentrace bylo potřeba proměřit absorbanci vzorku při 260, 280 a 320 nm. Absorpční maximum nukleových kyselin je při vlnové délce 260 nm. Výpočet čistoty RNA se provádí z poměru absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nm, při které absorbují nejvíce proteiny. Hodnotu absorbance při vlnové délce 320 nm je nutné

odečíst od každé hodnoty jako absorbanci pozadí. Pro stanovení čistoty RNA, která by se měla pohybovat od 1,8 do 2,0, získáme poměr ve tvaru:

$$\frac{A_{260} - A_{320}}{A_{280} - A_{320}}$$

Vzorky byly před měřením 80x ředěny „RNase free“ vodou. Na spektrofotometru Helios α bylo proměřeno absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek od 240 do 330 nm. Koncentrace RNA $c = 40 \mu\text{g/ml}$ odpovídá absorbanci $A_{260} = 1$. Pro zjištění koncentrace RNA ve vzorku byl použit vzorec:

$$c = \frac{A_{260} - A_{320}}{1000} \times 40 \times 80$$

3.4.2 Syntéza cDNA reversní transkripcí

Reverzní transkripce (RT) je metoda přepisu izolované RNA do cDNA. Reakce, při které je syntetizována cDNA, je katalyzována enzymem reverzní transkriptázou, což je RNA-dependentní DNA polymerasa. Nezbytným krokem reverzní transkripce je nasednutí oligonukleotidu na RNA templát. Pro tento proces se využívá dvou základních oligonukleotidů, a to oligo-dT řetězce nebo náhodných hexamerů.

Práce probíhala ve sterilním prostředí. Během přípravy byly vzorky co nejvíce uchovávány na ledu. Nejprve byla pro všechny vzorky připravena výchozí směs z roztoků v „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ [46]. Tento „RT master mix“ obsahoval na jeden vzorek:

RNase free H ₂ O	4,2 μl
10x RT pufr	2 μl
10x RT random primers	2 μl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 μl
RNase inhibitor	1 μl

Množství vzorku RNA obsahující 1 μg RNA bylo naředěno na objem 10 μl „RNase free“ vodou. K takto připraveným vzorkům bylo pipetováno 10 μl „RT master mixu“. Ze všech vzorků byly odebrány 2 μl , které sloužily jako negativní kontrola bez reverzní transkripce. Posledním krokem bylo přidání 1 μl reversní transkriptasy

MultiScribe™ (50 U/μl) k vzorkům, ze kterých byla předtím odebrána negativní kontrola. Vzorky i negativní kontroly byly stočeny a uchovány na ledu.

Připravené vzorky byly přemístěny do termocykléru. Nastavení cykléru: 25°C, 10 min (nasedání náhodných hexamerů); 37°C, 120 min (prodlužování řetězce cDNA); 85°C, 5 min (inaktivace RT); 4°C. Produkty byly uchovány v mrazáku při -80°C.

3.4.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

PCR je metoda s širokým využitím pro zkoumání DNA. Má obrovskou citlivost a je vysoce sekvenčně specifická. Pro použití této metody je třeba templátu DNA a to jedno- či dvouvláknového. Kvantitativní PCR se nejběžněji využívá pro analýzu genové exprese, chromozomových aberací, detekci patogenů, jednonukleotidový polymorfismus a kvantifikaci mRNA.

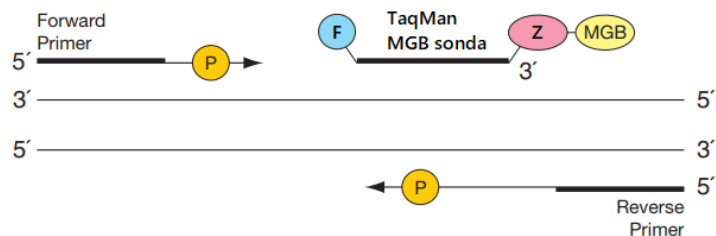
Kvantitativní PCR je metoda založená na sběru dat během celého procesu polymerázové reakce. Jedná se o kombinaci amplifikace a její detekce v každém kroku, které je dosaženo použitím fluorescenčních látek. Koncentrace produktu PCR koreluje s intenzitou fluorescence. Během qPCR dochází ke štěpení TaqMan sondy za využití 5' nukleasové aktivity DNA polymerasy (Obrázek 10, str. 30). Jedná se o hydrolyzační sondu, která obsahuje na svém 5' konci značící fluorescenční činidlo a na 3' konci zhasací činidlo. V průběhu reakce dochází ke zvyšování fluorescence, která je způsobená oddalováním fluorescenčního a zhasacího barviva [47] [48].

Metoda qPCR se dělí do čtyř hlavních fází: lineární fáze, časně exponenciální fáze, exponenciální fáze a fáze plató. V časně exponenciální fázi dosáhne fluorescence své prahové hodnoty, kdy je větší než fluorescence pozadí a právě tento cyklus se označuje C_T . Tato hodnota odpovídá množství původního vzorku a používá se k experimentálnímu vyhodnocení.

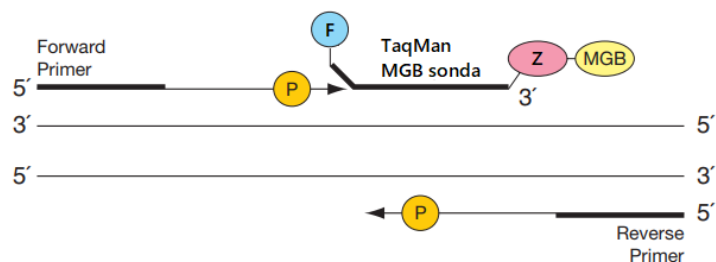
Nejprve bylo potřeba vzorky cDNA a negativní kontroly naředit 10-krát sterilní vodou. Následně bylo pipetováno do připravených PCR mikrozkušavek 15 μl předem připraveného „PCR mixu“, který na jeden vzorek obsahoval 10 μl ROCHE FastStart

Essential DNA Probes Master, 1 μ l TaqMan Gene Expression Assay (β -aktin, *CYP3A1* nebo *CYP3A2*) a 4 μ l „PCR grade“ H₂O

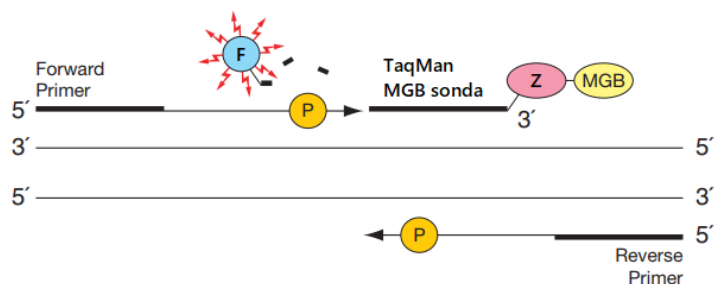
Polymerizace



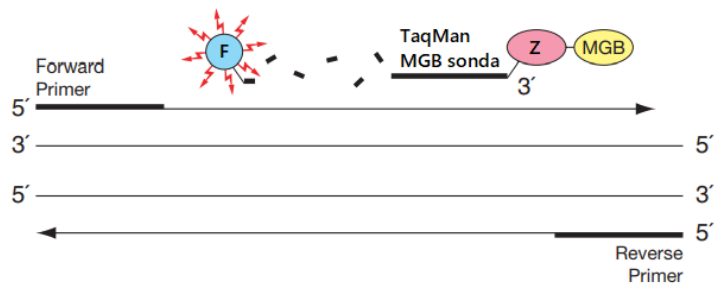
Uvolňování řetězce



Odštěpení fluorescenčního činidla



Dokončení polymerizace



Z = Zhášeč
 F = Fluorescenční činidlo
 P = AmpliTaq Gold DNA polymerasa

Obrázek 10: Schéma znázorňující proces vzniku fluorescence při štěpení TaqMan sondy. Žlutě značená část sondy „MGB“ z anglického „Minor Groove Binder“ je strukturní část sondy, která se koordinuje do malého žlábků cDNA. Tato vazba zvyšuje teplotu tání vláken sondy a cDNA. Tím umožňuje použití kratších sond a zároveň zvyšuje její specificitu [49]. Převzato a upraveno z [48].

K 15 µl „PCR mixu“ bylo pipetováno 5 µl 10-krát ředěné cDNA a jako blank bylo přidáno místo vzorku cDNA 5 µl sterilní vody. Pro každý vzorek cDNA byly připraveny dvě paralelní stanovení. Takto připravené vzorky byly vloženy do Real-time PCR cycleru Rotor Gene 2000 se 36ti místným rotorem. Pomocí programu Rotor Gene 5 byly nastaveny následující reakční podmínky:

95°C po dobu 10 minut (aktivace DNA polymerasy)

Následovalo 50 opakujících se cyklu s podmínkami:

95°C po dobu 15 sec (denaturace DNA řetězce)

60°C po dobu 60 sec (nasednutí primerů a sondy a syntéza řetězce DNA)

K vyhodnocení byl použit také program Rotor Gene 5, pomocí kterého byly určeny hodnoty C_T značící číslo cyklu, ve kterém amplifikační křivka protíná linii „threshold“ se signifikantním nárůstem detekce signálu.

3.4.4 Analýza dat qPCR

Kromě cílových genů *CYP3A1* a *CYP3A2* byla kvantitativní PCR provedena i pro β -aktin jako referenční gen s konstantní expresí. Z výsledků dvou paralelních měření pro každý vzorek cDNA byla vypočítána hodnota aritmetického průměru čísla cyklu C_T , vyjadřující relativní zastoupení sledovaných genů ve vzorku. Porovnáním hodnot C_T cílových genů a genu referenčního byla určena hodnota ΔC_T dle vzorce:

$$\Delta C_{T,CYP3A1} = C_{T,CYP3A1} - C_{T,\beta-aktin}$$

$$\Delta C_{T,CYP3A2} = C_{T,CYP3A2} - C_{T,\beta-aktin}$$

Míra změny exprese genů *CYP3A1* a *CYP3A2* v játrech izolovaných z potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem, Sudanem I a jejich kombinacemi (premedikace) proti játrům nepremedikovaných potkanů (kontrola) je vyjádřena pomocí hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_T}$, která je počítána dle vzorce:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\overline{\Delta C_T}(\text{premedikace}) - \overline{\Delta C_T}(\text{kontrola}))}$$

3.5 STANOVENÍ PROTEINOVÉ EXPRESE CYP3A

Pro stanovení relativního zastoupení proteinu CYP3A byly vzorky mikrosomů analyzovány metodou SDS-PAGE a po přenesení na membránu metodou Western Blot byla provedena imunodetekce.

3.5.1 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE)

Použité roztoky:

4x koncentrovaný vzorkový pufr – 0,063 mol/l Tris/HCl, 2 % SDS (w/v), 10 % glycerol, 0,003 % bromfenolová modř, 5 % 2-merkaptoethanol (pH 6,8)

Elektrodový pufr – 0,192 mol/l glycín, 0,025 mol/l Tris, 0,1 % SDS (pH 8,3)

Barvicí lázeň – 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250 - CBBR (w/v), 46 % ethanol, 9,2 % kyselina octová

Odbarvovací lázeň – 10 % kyselina octová a 25 % ethanol

Spodní separační gel (10%) – 4 ml destilovaná voda, 3,3 ml 30% akrylamid (29 % akrylamid + 1 % bisakrylamid), 2,5 ml 1,5M Tris (pH 8,8), 100 μ l 10 % SDS, 4 μ l TEMED, 100 μ l 10 % APS

Vrchní zaostřovací gel (4%) – 2,2 ml destilovaná voda, 400 μ l 30 % akrylamid (29 % akrylamid, 1 % bisakrylamid), 380 μ l 1,5M Tris (pH 6,8), 30 μ l 10 % SDS, 3 μ l TEMED, 30 μ l 10 % APS

Skla a hřebeny pro elektroforézu byly umyty ethanolem. Spodní separační gel byl připraven, po napipetování mezi skla převrstven destilovanou vodou a ponechán 30 minut stát při laboratorní teplotě. Po ztuhnutí gelu byla voda odsáta filtračním papírem a byl připraven vrchní zaostřovací gel. Ten byl napipetován na separační gel. Před ztuhnutím byl na něj aplikován hřeben pro vytvoření jamek - byl ponechán stát 30 minut pro ztuhnutí. Vzorky mikrosomů byly připraveny se vzorkovým pufrem a destilovanou vodou. Poté byly promíchány na vortexu a povařeny v suchém termobloku při 100 °C po dobu 5 minut. Po ztuhnutí gelu byl hřeben opatrně vyndán. Vzorky byly pomocí pipety s prodlouženou špičkou aplikovány po 20 μ l do jamek [50].

Do aparatury pro elektroforézu byl nalit elektroodvový pufr. Poté byly vloženy gely. Elektroforéza probíhala při napětí 200 V po dobu 70 minut. Následně byl jeden gel barven 60 minut v barvicí lázni. Druhý gel se použil pro přenos. Po barvení byl gel ponechán přes noc v odbarvovací lázni. Poté byly gely uchovány v destilované vodě.

3.5.2 Metoda Western Blot a imunodetekce

Použité roztoky:

Pufr PBS-Triton X100 – 0,134 mol/l NaCl, 1 mmol/l NaHPO₄, 1,8 mmol/l Na₂HPO₄, 10 % Triton (pH 7,2)

Přenosový pufr – 0,192 mol/l glycin, 0,025 mol/l Tris (pH 8,3), 10% methanol

Roztok PONCEAU – 0,5 % PONCEAU červen v 1% kyselině octové

Blokovací roztok – 5 % sušené odtučněné mléko + PBS Triton X100

Vyvíjecí pufr ALP – 100 mmol/l Tris/HCl, 150 mmol/l NaCl, 1 mmol/l MgCl₂·6H₂O (pH 9)

Druhý gel byl na 25 minut namočen v přenosovém pufru. Papíry Whatman a PVDF membrána byly nastříhány tak, aby odpovídaly rozměrem gelu. Nastříhané papíry byly smočeny v přenosovém pufru. PVDF membrána byla namočena postupně na 30 s v čistém methanolu, na 60 s v destilované vodě a na 5 minut v roztoku přenosového pufru a methanolu. Na plotnu blotovacího zařízení byly umístěny postupně 3 Whatman papíry, PVDF membrána, gel a další 3 Whatman papíry. Blotovací zařízení bylo zapojeno na 3 mA/1 cm² po dobu 30 minut.

Po blotování byla membrána namočena v roztoku PONCEAU po dobu 20 s. Následně byla promyta v destilované vodě a rozstříhnuta dle markeru Precision Protein Plus™ Dual Color Standards tak, aby jedna část obsahovala CYP3A o molekulové hmotnosti 58 kDa a druhá glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasu (GAPDH) o molekulové hmotnosti 35,6 kDa. GAPDH je protein s konstitutivní expresí – jeho imunodetekce byla provedena jako kontrola pro stejné množství nanášených mikrosomálních proteinů v jamkách. Obě membrány byly následně promývány v blokovacím roztoku po dobu 60 minut. Poté byla membrána s GAPDH inkubována v roztoku primární králičí protilátky proti GAPDH ředěné blokovacím roztokem

v poměru 1:5000 a membrána s CYP3A v roztoku primární králičí protilátky proti CYP3A ředěné blokovacím roztokem v poměru 1:600. Inkubace probíhala přes noc v chlazené místnosti.

Druhý den byly membrány promyty 4x 5 minut v blokovacím roztoku. Následně byly inkubovány po dobu 60 minut v roztoku sekundární protilátky vytvořené proti králičímu IgG značené alkalickou fosfatase ředěné blokovacím roztokem v poměru 1:10000. Poté byly membrány promyty 2x 5 minut v blokovacím roztoku, 2x 5 minut v roztoku PBS-Triton a 5 minut v destilované vodě.

Pro vyvíjení byl připraven roztok z 5 ml pufru ALP, 33 μ l NBT a 16,5 μ l BCIP. Tento roztok byl vždy připraven těsně před použitím v lékovce zabalené v alobalu, abychom minimalizovali nežádoucí fotolytické reakce. Následně byly membrány v tomto roztoku inkubovány. Průběh reakce indikovalo zobrazení proužků na membráně. Reakce byla následně zastavena přenesením membrány do destilované vody.

3.6 STANOVENÍ ENZYMOVÉ AKTIVITY CYP3A

3.6.1 Příprava inkubačních směsí

Pro stanovení enzymové aktivity CYP3A byla použita reakce přeměny testosteronu na 6 β -hydroxytestosteron, která je specifickou reakcí právě tohoto enzymu [51]. Po inkubaci testosteronu s jaterními mikrosomy z premedikovaných a kontrolních potkanů v přítomnosti NADPH jako kofaktoru CYP a extrakci vytvořených metabolitů bylo analyzováno množství 6 β -hydroxytestosteronu pomocí HPLC.

Každá inkubační směs byla připravena ve třech paralelních vzorcích. Celkový objem každého inkubačního vzorku byl 500 μ l. Reakční směs obsahovala:

- fosfátový pufr (0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 7,4)
- 0,5 mg/ml proteinu mikrosomální frakce potkana
- 50 μ M testosteron (2,5 μ l 10mM testosteron v methanolu)
- 50 μ l NADPH-generujícího systému (zásobní roztok: 1mM NADP^+ , 10mM D-glukosa-6-fosfát, 1 U/ml D-glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, 10mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Směs bez NADPH byla preinkubována při 37°C po dobu 5 minut. Reakce byla spuštěna pipetováním generujícího systému a probíhala v inkubátoru za přístupu vzduchu po dobu 15 minut při 37°C a třepání při 450 RPM. První kontrolní inkubační směs neobsahovala generující systém a druhá kontrolní směs neobsahovala mikrosomy. Místo generujícího systému a mikrosomů byl do kontrol pipetován pufr. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 100 µl roztoku obsahujícího 1M Na₂CO₃ a 2M NaCl. Následně bylo do roztoku přidáno 5 µl 1mM fenacetinu, který sloužil jako vnitřní standard.

Vzniklé metabolity byly extrahovány dvakrát 1 ml dichlormethanu po dobu 2 minut při 1 400 RPM, vodná a organická fáze byly separovány pomocí centrifugace po dobu 5 minut při 13 000 RPM. Spodní organická fáze byla odebrána do čisté mikrozkušavky a odpařena do sucha ve vakuové odparce při 37°C.

3.6.2 Stanovení 6β-OH-testosteronu pomocí HPLC

Metabolity testosteronu byly separovány a kvantifikovány pomocí metody HPLC za použití lineárního gradientu 0-100 % mobilní fáze B po dobu 27 minut. Mobilní fáze A byla tvořena 50% (v/v) methanolem, mobilní fáze B obsahovala 75% (v/v) methanol. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5 C18, 250 x 4 mm při teplotě 35°C udržované termostatem. Konstantní průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,6 ml/min. Nástřik na kolonu činil 20 µl. Pro analýzu byl použit HPLC systém Agilent Technologies 1200 Series. Detektor byl nastaven na měření při čtyřech vlnových délkách: 220, 254, 280 a 313 nm. Testosteron a jeho metabolit 6β-OH-testosteron byly detekovány při vlnové délce 254 nm a kvantifikovány vztažením jejich plochy k ploše vnitřního standardu (fenacetinu). Následné vyhodnocení bylo provedeno za použití kalibrační křivky s rozsahem 10 až 250 µmol/l standardu 6β-OH-testosteronu. Plochy píků odpovídající 6β-OH-testosteronu byly vztaženy na plochu píku vnitřního standardu.

4 VÝSLEDKY

4.1 STANOVENÍ KONCENTRACE IZOLOVANÉ RNA

Ve vzorcích RNA izolované z jater potkanů ještě před zahájením mé bakalářské práce byla spektrofotometrickým měřením absorpčních spekter stanovena koncentrace RNA. Absorpční maximum UV spektra vzorků by mělo být při vlnové délce 260 nm. Vzorky byly před měřením 80-krát ředěny „RNase free“ vodou. Získané hodnoty čistoty a koncentrace vzorků jsou uvedeny v tabulce 2. Všechny vzorky RNA byly použitelné v dalších experimentech provedených v rámci předkládané bakalářské práce.

Tabulka 2: Hodnoty koncentrace a čistoty izolované RNA. Vzorky: CTRL – kontrola, Sud I – Sudan I a BaP- benzo[a]pyren. Čísla 1-3 za označením premedikační skupiny odpovídají jednotlivým vzorkům po třech paralelních izolacích RNA.

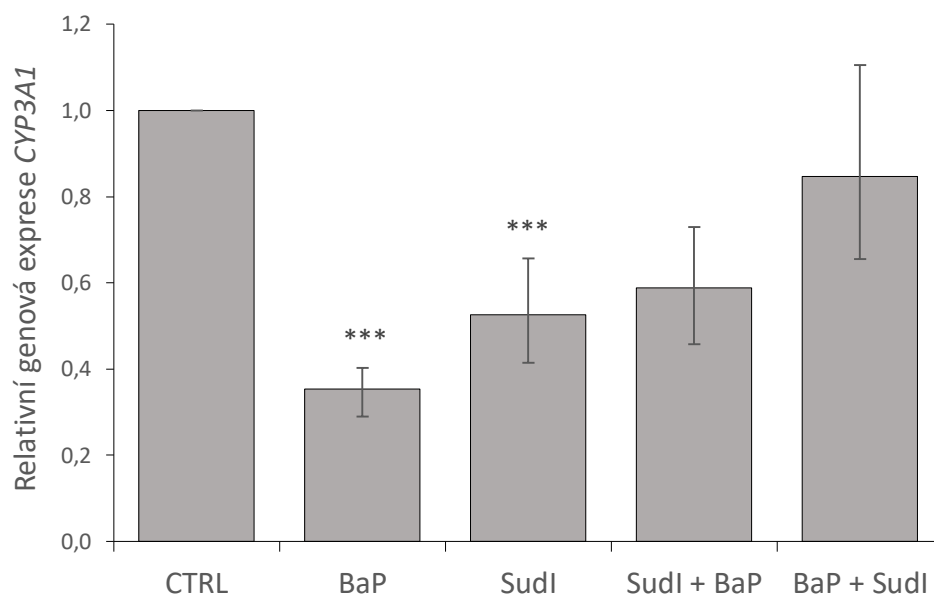
Premedikace	Čistota	c(RNA) [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
CTRL 1	1,8	2,6
CTRL 2	1,9	3,9
CTRL 3	1,8	2,3
Sud I 1	1,9	5,5
Sud I 2	1,9	4,9
Sud I 3	1,8	4,3
BaP 1	1,9	3,9
BaP 2	1,9	6,0
BaP 3	1,9	4,9
Sud I + BaP 1	1,8	3,4
Sud I + BaP 2	1,8	2,5
Sud I + BaP 3	1,8	1,7
BaP + Sud I 1	1,9	2,7
BaP + Sud I 2	1,7	2,2
BaP + Sud I 3	1,7	2,1

4.1 GENOVÁ EXPRESE *CYP3A1/2*

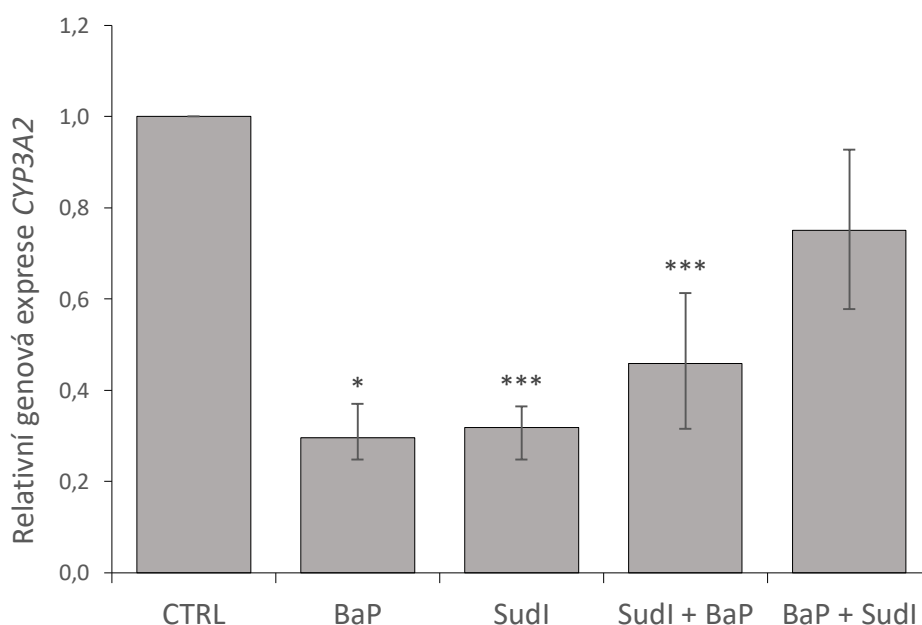
Pomocí reverzní transkripce byla z 1 µg získané RNA připravena cDNA. Tyto vzorky byly analyzovány metodou kvantitativní PCR z hlediska exprese β -aktinu jako referenčního genu. Relativní míra genové exprese *CYP3A1* resp. *CYP3A2* u premedikovaných potkanů byla porovnána se skupinami kontrolními. V žádné z premedikačních skupin nedošlo k indukci exprese sledovaných genů. Naopak byl pozorován statisticky významný pokles genové exprese *CYP3A1* v játrech potkanů vystavených samotnému BaP nebo Sud I a *CYP3A2* v játrech potkanů vystavených samotným látkám i kombinaci podání Sud I před BaP. U ostatních premedikací došlo oproti kontrolní skupině zvířat také k poklesu genové exprese obou genů (Tabulka 3, Obrázek 11 a 12, str. 38).

*Tabulka 3: Relativní kvantifikace genů CYP3A1 a CYP3A2. Vyhodnocení dat získaných qPCR je popsáno v kapitole 3.4.4. Statistická významnost výsledků byla vyhodnocena pomocí programu REST 2009. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.*

<i>CYP3A1</i>	$\Delta C_T \pm SD$	Míra indukce	Statistická významnost
CTRL	-5,06 \pm 0,16	1,0	-
BaP	-3,56 \pm 0,31	0,353	***
SudI	-4,14 \pm 0,49	0,526	***
SudI + BaP	-4,30 \pm 0,25	0,588	-
BaP + SudI	-4,82 \pm 0,29	0,847	-
<i>CYP3A2</i>	$\Delta C_T \pm SD$	Míra indukce	Statistická významnost
CTRL	-4,33 \pm 0,27	1,0	-
BaP	-2,57 \pm 0,17	0,295	*
SudI	-2,67 \pm 0,15	0,318	***
SudI + BaP	-3,21 \pm 0,37	0,459	***
BaP + SudI	-3,92 \pm 0,30	0,751	-



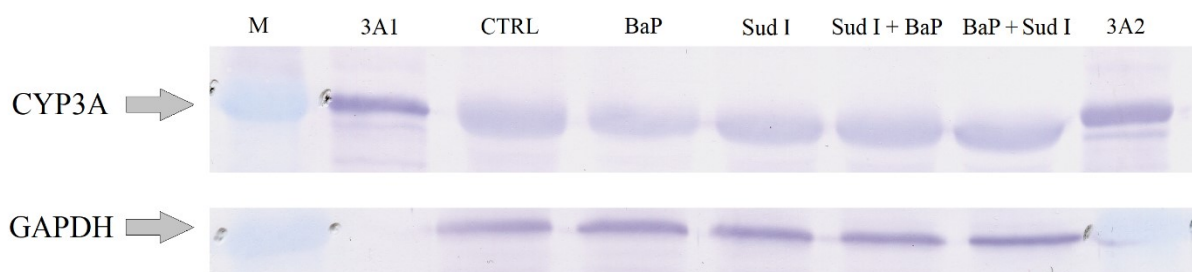
Obrázek 11: Relativní genová exprese CYP3A1 v játrech potkanů premedikovaných BaP, Sud I a jejich kombinacemi v porovnání s nepremedikovanými potkany. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Statistická významnost výsledků byla vyhodnocena pomocí programu REST 2009. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.



Obrázek 11: Relativní genová exprese CYP3A2 v játrech potkanů premedikovaných BaP, Sud I a jejich kombinacemi v porovnání s nepremedikovanými potkany. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnoty $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Statistická významnost výsledků byla vyhodnocena pomocí programu REST 2009. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ a * $p < 0,05$.

4.2 PROTEINOVÁ EXPRESE CYP3A

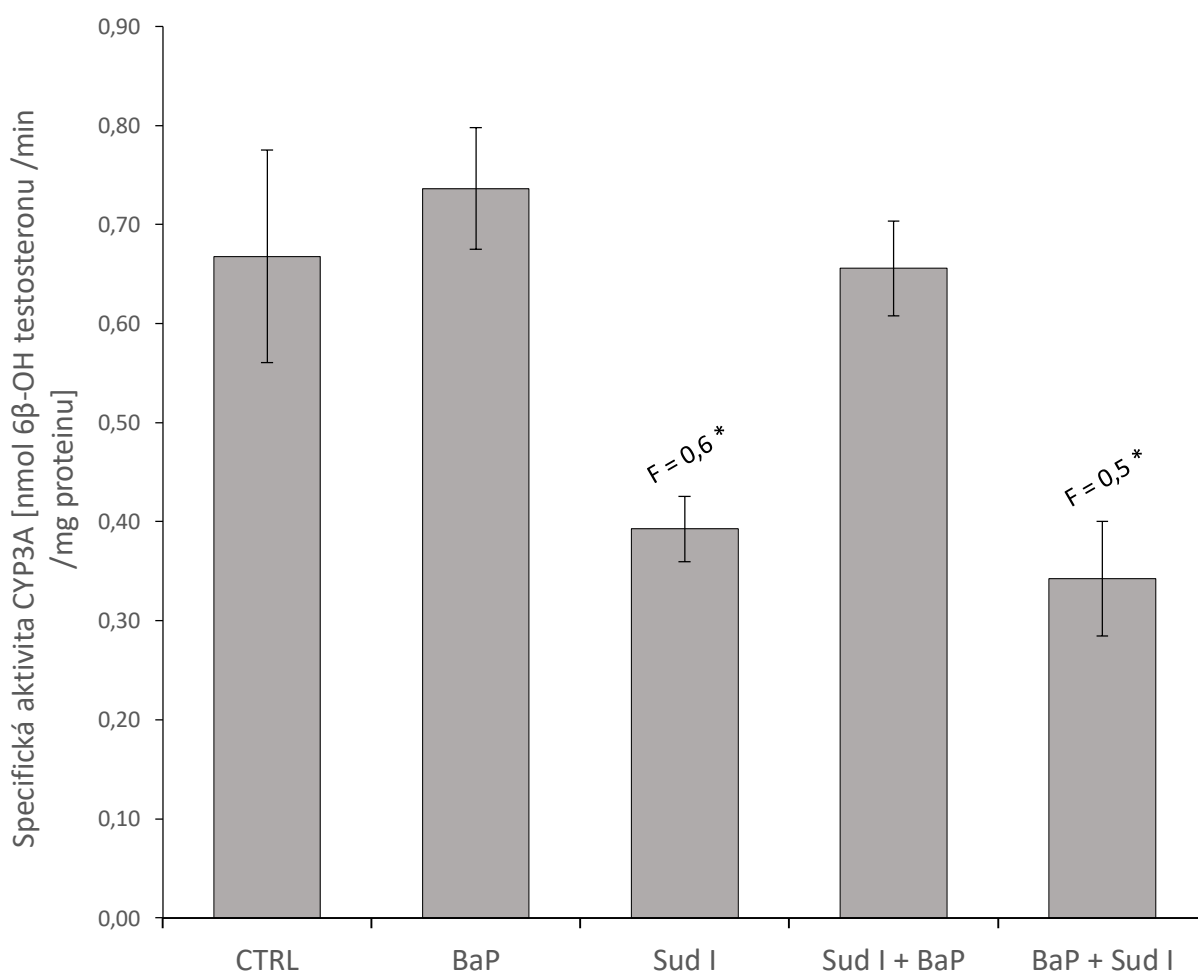
Proteiny z mikrosomálních frakcí byly rozděleny v SDS-polyakrylamidovém gelu podle molekulových hmotností. Poté byl proveden přenos proteinů na PVDF membránu metodou Western blot. Následnou imunodetekcí polyklonální protilátkou proti CYP3A bylo zjištěno relativní zastoupení CYP3A v játrech jednotlivých premedikačních skupin potkanů. Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH), která je v buňkách produkována konstitutivně, byla použita jako kontrola stejné nanášky proteinů. Z vyvolaných membrán je patrné, že v případě samostatné aplikace BaP i Sud I došlo k mírnému poklesu hladiny CYP3A v játrech potkanů. Ukázka jedné z vyvolaných membrán je na obrázku 16.



Obrázek 13: Imunodetekce CYP3A v mikrosomálních frakcích jater potkanů kontrolních (CTRL), premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (Sud I) a jejich kombinacemi. 3A1 a 3A2 odpovídá standardu potkaního rekombinantního CYP3A1 resp. CYP3A2 v SupersomechTM. M odpovídá použitému markeru.

4.3 STANOVENÍ AKTIVITY CYP3A

Pro stanovení aktivity CYP3A v jaterních mikrosomálních frakcích, jsme využili metodu 6 β -hydroxylace testosteronu, která je specificky katalyzována podrodinou CYP3A. Při této redoxní reakci dochází ke vzniku produktu 6 β -OH testosteronu [52] [53]. Metabolity této hydroxylace byly detekovány pomocí metody HPLC s UV detekcí. Samostatné podání BaP a kombinované podání Sud I před BaP nevyvolalo žádné změny v aktivitě CYP3A. V jaterních mikrosomech vystavených samotnému Sud I a oběma látkám v pořadí BaP – Sud I došlo k poklesu aktivity CYP3A na přibližně poloviční hodnoty oproti kontrolním vzorkům. Specifické aktivity CYP3A příslušných mikrosomálních frakcí jsou vyhodnoceny na Obrázku 17.



Obrázek 14: Specifická aktivita CYP3A v jaterních mikrosomálních frakcích potkanů kontrolních (CTRL) a premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (Sud I) nebo jejich kombinacemi (Sud I + BaP a BaP + Sud I). Aktivita byla stanovena 6 β -hydroxylací testosteronu. Statistická významnost výsledků byla vyhodnocena pomocí T-testu (tři paralelní měření). Hodnoty „F“ pak značí násobek aktivity CYP3A oproti kontrole. * $p < 0,05$.

5 DISKUZE

Úlohou bakalářské práce bylo studovat vliv benzo[*a*]pyrenu a Sudanu I podávaných laboratorním potkanům samostatně nebo ve vzájemné kombinaci na míru proteinové i mRNA exprese a aktivitu enzymů podrodiny CYP3A. Sledovaným orgánem byly v našem případě játra, u kterých je zastoupení CYP3A nejvýraznější.

V rámci genové exprese jsme metodou kvantitativní PCR stanovili relativní zastoupení mRNA pro *CYP3A1* a *CYP3A2* v játrech potkanů premedikovaných BaP, Sudanem I nebo jejich kombinacemi. Ve všech ze sledovaných skupin došlo k poklesu relativního zastoupení mRNA pro *CYP3A1* resp. *CYP3A2* oproti kontrolním skupinám potkanů. V případě potkanů premedikovaných samostatně BaP resp. Sudanem I došlo k poklesu hladiny mRNA nejméně na poloviční hodnoty oproti kontrole. V případě potkanů premedikovaných kombinovaně BaP a Sudanem I byl pozorován menší pokles genové exprese *CYP3A1/2* oproti samostatně premedikovaným potkanům.

Hodnocení výsledků v rámci proteinové exprese jsme provedly jen vizuálně. Z něho bylo zjevné, že proteinová exprese CYP3A po samostatné premedikaci BaP a Sud I oproti kontrole poklesla. Výsledky imunodetekce CYP3A tak odpovídaly výsledkům experimentů na genovou expresi podrodiny *CYP3A*.

Studované látky BaP a Sudan I jsou prokazatelně aktivátory receptoru aromatických uhlovodíků (AhR), který reguluje expresi enzymu CYP1A1, primárně se podílejícího na metabolismu BaP a Sudanu I [54] [55]. Po premedikaci BaP nebo Sudanem I bylo pozorováno v relativním zastoupení mRNA enzymů podrodin *CYP1A* v játrech řádově 1000 násobné navýšení [56]. Exprese enzymů CYP3A1 a CYP3A2 je ale regulována pregnanovým X receptorem (PXR) [41]. K detailnějšímu vysvětlení příčiny poklesu genové exprese *CYP3A* by bylo třeba v budoucnu prozkoumat případné interakce mezi BaP resp. Sud I a receptorem PXR.

Jak již bylo sděleno, při kombinované premedikaci BaP a Sudanem I resp. Sudanem I a BaP, došlo rovněž k poklesu genové exprese izoform podrodiny *CYP3A*. Tato represe byla v případě obou genů při aplikaci BaP před Sudanem I nižší než při aplikaci v opačném pořadí. Je otázkou, jestli tento trend souvisí se vzájemnou interakcí podávaných látek při jejich současné aplikaci. Můžeme ale říct, že kombinovaná

premedikace BaP a Sudanu I způsobuje na genové i proteinové úrovni menší represi, než jejich samotné premedikace.

BaP a Sudan I neměli rovněž žádný aktivační efekt na 6 β -hydroxylaci testosteronu při stanovování enzymové aktivity podrodiny CYP3A. Žádná z aplikací studovaných látek nevedla u skupin laboratorních potkanů k statisticky významnému nárůstu tvorby 6 β -hydroxylovaných metabolitů. Jedině samostatná aplikace BaP vedla k mírnému nárůstu aktivity, avšak v intervalu statistické odchylky oproti kontrole. Samostatná aplikace Sud I a kombinovaná aplikace BaP + Sud I vedla k poklesu aktivity CYP3A na přibližně poloviční hodnotu proti hodnotám kontrolním. Kombinovaná aplikace Sud I + BaP však oproti kontrole nevykazovala vliv na aktivitu enzymu. Přibližně poloviční pokles aktivity enzymů oproti kontrole v případě samostatné premedikace Sudanu I a kombinované premedikace Sud I + BaP zhruba odpovídá analogickému poklesu exprese CYP3A1 resp. CYP3A2 na genové i proteinové úrovni. V jaterních mikrosomech potkanů vystavených samostatně podanému BaP a kombinovanému podání Sud I před BaP nedošlo k žádným změnám v aktivitě CYP3A.

Důvod získaných výsledků v případě samostatné premedikace BaP a kombinace Sud I + BaP lze z námi získaných dat těžko odhadnout. Je otázkou jestli tento důvod souvisí s citlivostí enzymové aktivity jednotlivých podrodin CYP na faktory jako čas a teplota, při kterých jsou vzorky skladovány či procesovány při izolaci mikrosomů, anebo se spíše jedná o chybu na straně lidského faktoru. V rámci jiné práce v naší laboratoři byl pozorován výsledek analogického experimentu, při kterém po podání BaP genová exprese *CYP3A* v játrech potkanů oproti kontrole částečně poklesla a aktivita těchto enzymů se od kontrolních vzorků výrazně nelišila [57]. Tento rozdíl však nebyl zdaleka tak výrazný jako v našich výsledcích.

Při porovnání vlivu BaP na podrodiny CYP3A lidských a potkaních izoform pozorujeme rovněž rozdílné výsledky.. Na rozdíl od našich výsledků, při vystavení BaP v buněčné linii karcinomu lidských jater, byla pozorována indukce genové exprese lidské izoformy *CYP3A4* [58]. Je známo, že v případě lidské izoformy byla při vystavení BaP pozorována indukce *CYP3A4* přes PXR [59]. Indukce u lidských *CYP3A4* oproti represi potkaních *CYP3A1/2* na genové úrovni při vystavení BaP tak může být způsobeno mezidruhovými rozdíly jednotlivých izoform CYP.

Vliv poklesu exprese CYP3A na samotnou kancerogenezi BaP je rovněž otázkou. Jak již bylo v kapitole 1.1.2.2. sděleno, mezi významné metabolity CYP3A patří mj. BaP-3-ol, který zároveň řadíme mezi detoxikační metabolity BaP [60]. Můžeme tedy předpokládat, že existuje kauzální vztah mezi poklesem exprese CYP3A a snížením detoxikace BaP. To by mohlo mít za následek zvýšení jeho aktivace jinými CYP, a tedy v konečném důsledku zvýšení tvorby aduktů s DNA.

6 ZÁVĚR

V rámci předkládané bakalářské práce byla izolovaná RNA pomocí reverzní transkripce úspěšně převedena na cDNA.

Metodou kvantitativní PCR jsme pozorovaly pokles exprese genů *CYP3A1* a *CYP3A2* v játrech u všech potkanů premedikovaných samostatně nebo společně benzo[*a*]pyrenem nebo Sudanem I.

Metodou Western blot s následnou imunodetekcí jsme rovněž pozorovaly pokles exprese proteinů podrodiny CYP3A v játrech potkanů při samostatné premedikaci benzo[*a*]pyrenem resp. Sudanem I.

Byla stanovena specifická aktivita CYP3A v jaterních mikrosomálních frakcích potkanů všech premedikačních skupin sledováním markerové reakce této podrodiny CYP, 6β-hydroxylace testosteronu. Enzymová aktivita CYP3A byla v játrech potkanů premedikovaných samostatně Sudanem I a kombinovaně BaP + Sud I oproti kontrolním potkanům významně snížena.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Causes of death statistics [Internet]. Eurostat. 2017 [citováno 5. únor 2018]. Dostupné z: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes_of_death_statistics
2. Warner KE. The effects of the anti-smoking campaign on cigarette consumption. *Am J Public Health*. 1977;(67):645–650.
3. Larsen JC. Legal and illegal colours. *Trends Food Sci Technol*. 2008;(19):64–9.
4. Hugo J, Vokurka M. Velký lékařský slovník. 4. 2004.
5. Farlex Partner Medical Dictionary. 2012.
6. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*. 1981;66(6):1191–308.
7. Hussain, Harris. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res*. 1998;58:4023–37.
8. Stratil P, Kubáň V. Princip karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chem Listy*. 2004;(98):379–387.
9. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2015.
10. Chung KT. Azo dyes and human health: A review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. (34):233–61.
11. Chequer FMD, Dorta DJ, Palma de Oliveira D. Azo Dyes and Their Metabolites: Does the Discharge of the Azo Dye into Water Bodies Represent Human and Ecological Risks? In: *Advances in Treating Textile Effluent*. InTech; 2011.
12. Stiborová M, Martínek V, Semanská M, Hodek P, Dračínský M, Cvačka J, Schmeiser H, Frei E. Oxidation of the carcinogenic non-aminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxy-naphthalene (Sudan I) by cytochromes P450 and peroxidases: a comparative study. *Interdiscip Toxicol*. 2009;(2):195–200.
13. Fonovich TM. Sudan dyes: are they dangerous for human health? *Drug Chem Toxicol*. 2013 Jul;36(3):343–52.
14. Stiborová M, Dračínská H, Martínek V, Svášková D, Hodek P, Milichovský J, Hejduková Ž, Brotánek J, Schmeiser H, Frei E. Induced expression of cytochrome P450 1A and NAD(P)H:quinone oxidoreductase determined at mRNA, protein, and enzyme activity levels in rats exposed to the carcinogenic azo dye 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I). *Chem Res Toxicol*. 2013;(26):290–9.
15. Martínek V, Stiborová M. Metabolism of Carcinogenic Azo Dye Sudan I by Rat, Rabbit, Minipig and Human Hepatic Microsomes. *Collect Czech Chem Commun*. 2002;67:1883–98.
16. Stiborová M, Martínek V, Rýdlová H, Hodek P, Frei E. Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Res*. 2002;(62):5678–84.
17. Tomaniová M, Kocourek V, Hajšlová J. Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chem Listy*. 1997;(91):357–66.
18. Gehle K. Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): Key Concepts | Environmental Medicine & Environmental Health Education. Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2009.
19. Kim KH, Jahan SA, Kabir E, Brown RJ. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int*. 2013;(60):71–80.

20. Ouyang W. Direct evidence for the critical role of NFAT3 in benzo[a]pyrene diol-epoxide-induced cell transformation through mediation of inflammatory cytokine TNF induction in mouse epidermal C141 cells. *Carcinogenesis*. 2007;(28):2218–26.
21. Verma N. Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics*. 2012;(12):1731–55.
22. Wang Q, Xue Y. Characterization of Solid Tumors Induced by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mice. *Med Sci Monit Basic Res*. 2015;(21):81–5.
23. Arnould JP, Kubiak R, Belowski J, Belegaud J, Szczeklik J. Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in leukocytes of coke oven workers. *Pathol Biol*. 2000;(48):548–53.
24. Barhoumi R, Mouneimne Y, Ramos E, Morisseau C, Hammock BD, Safe S, Parrish AR, Burghardt RC. Multiphoton spectral analysis of benzo[a]pyrene uptake and metabolism in a rat liver cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;(253):45–56.
25. Stiborová M, Moserová M, Černá V, Indra R, Dračinský M, Šulc M, Henderson CJ, Wolf CR, Schmeiser HH, Phillips DH, Frei E, Artl VM. Cytochrome b5 and epoxide hydrolase contribute to benzo[a]pyrene-DNA adduct formation catalyzed by cytochrome P450 1A1 under low NADPH:P450 oxidoreductase conditions. *Toxicology*. 2014;(318):1–12.
26. Šulc M, Indra R, Moserová M, Schmeiser HH, Frei E, Artl VM, Stiborová M. The impact of individual cytochrome P450 enzymes on oxidative metabolism of benzo[a]pyrene in human livers. *Environ Mol Mutagen*. 2016;(53):229–35.
27. Knejzlík Z, Káš J, Ruml T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem Listy*. 2000;(94):913–914.
28. Stiborová M. Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace.
29. Guengerich FP. Cytochrome P450. In: *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley & Sons; 2001.
30. McDonnell AM. Basic Review of the Cytochrome P450 System. *J Adv Pract Oncol*. 2013;(4):263–8.
31. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;(138):103–41.
32. Omura T, Sato R. The carbon monoxide - binding pigment of liver microsomes. II. solubilization, purification, and properties. 1964;(239):2379–85.
33. Nelson DR. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys*. 1999;(369):1–10.
34. Luo G, Guenther T, Gan LS, Humphreys WS. CYP3A4 induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development. *Curr Drug Metab*. (5):483–505.
35. Debri K, Boobis AR, Davies DS, Edwards RJ. Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues. *Biochem Pharmacol*. 1995;(50):2047–56.
36. He F, Zhang W, Zeng C, Xia C, Xiong Y, Zhang H, Huang S, Liu M. Mechanism of Action of Panaxytriol on Midazolam 1'-Hydroxylation and 4-Hydroxylation Mediated by CYP3A in Liver Microsomes and Rat Primary Hepatocytes. *Biol Pharm Bull*. 2015;(10):1470–7.
37. Martignoni M, Groothuis GMM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006;2(6):875–94.

38. Wrighton SA, Schuetz EG, Thummel KE, Shen DD, Korzekwa KR, Watkins PB. The human CYP3A subfamily: practical considerations. *Drug Metab Rev.* 2000;(32):339–61.
39. Stiborová M, Hudeček J, Hodek P, Frei E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. 1999;(93):229–37.
40. Ekroos M, Sjogren T. PDB ID 2J0D (Structural Basis for Ligand Promiscuity in Cytochrome P450 3A4). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;(103):13682–7.
41. Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, Hamilton G, Rizzo C, Jolley S, Gilbert D, Downey A, Mudra D, Graham R, Carroll K, Xie J, Madan A, Parkinson A, Christ D, Selling B, LeCluyse E, Gan L. CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2002;(30):795–804.
42. Ratajewski M, Walczak-Drzewiecka A, Sałkowska A, Dastych J. Aflatoxins upregulate CYP3A4 mRNA expression in a process that involves the PXR transcription factor. *Toxicol Lett.* 2011;(205):146–53.
43. Shukla SJ, Sakamuru S, Huang R, Moeller TA, Shinn P, VanLeer D, Auld DS, Austin CP, Xia M. Identification of Clinically Used Drugs That Activate Pregnane X Receptors. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(1):151–9.
44. Chrencik JE, Orans JO, Moore LB, Xue Y, Peng L, Collins JL, Wisely GB, Lambert MH, Klier SA, Redinbo MR. PDB 1SKX (Structural disorder in the complex of human pregnane x receptor and the macrolide antibiotic rifampicin). *Mol Endocrinol.* 2005;(19):1125–34.
45. Kleinová S. Bakalářská práce. UK Praha; 2016.
46. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits - Applied Biosystems. Thermo Fisher Scientific Inc.; 2016.
47. Wong M, Medrano J. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques.* 2005;39(1):75–85.
48. TaqMan® Gene Expression Master Mix Protocol. Applied Biosystems; 2007.
49. Kutuyavin I, Afonina I, Mills A, Gorn V, Lukhtanov E, Belousov E, Singer M, Walburger D, Lokhov S, Gall A, Dempcy R, Reed M, Meyer R, Hedgpeth J. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(2):655–61.
50. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. Bio-Rad Laboratories, Inc.;
51. Maezawa K, Matsunaga T, Takezawa T, Kanai M, Ohira S, Ohmori S. Cytochrome P450 3As Gene Expression and Testosterone 6 β -Hydroxylase Activity in Human Fetal Membranes and Placenta at Full Term. *Biol Pharm Bull.* 2010;33:249–54.
52. Kobayashi K, Urashima K, Shimada N, Chiba K. Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(5):889–96.
53. Usmani K, Tang J. Human cytochrome P450: metabolism of testosterone by CYP3A4 and inhibition by ketoconazole. *Curr Protoc Toxicol.* 2004;4:Unit4.13.
54. Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Ishikawa T. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97(2):779–82.
55. Lubet RA, Connolly G, Kouri RE, Nebert DW, Bigelow SW. Biological effects of the Sudan dyes. Role of the Ah cytosolic receptor. *Biochem Pharmacol.* 1983;32(20):3053–8.

56. Gajdík Z. Bakalářská práce. UK Praha; 2015.
57. Holecová J. Diplomová práce. UK Praha; 2017.
58. Kumagai T, Suzuki H, Sasaki T, Sakaguchi S, Miyairi S, Yamazoe Y, Nagata K. Polycyclic aromatic hydrocarbons activate CYP3A4 gene transcription through human pregnane X receptor. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012;27(2):200–6.
59. Luckert C, Ehlers A, Buhrke T, Seidel A, Lampen A, Hessel S. Polycyclic aromatic hydrocarbons stimulate human CYP3A4 promoter activity via PXR. *Toxicol Lett.* 2013;222(2):180–8.
60. Huang MT, Wood AW, Chang RL, Yagi H, Sayer JM, Jerina DM, Conney AH. Inhibitory Effect of 3-Hydroxybenzo(a)pyrene on the Mutagenicity and Tumorigenicity of (+/-)-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. 1986;46:10.
61. Wu J, Cao Y, Zhang Y, Liu Y, Hong J, Zhu L, Ge G, Yang L. Deoxyschizandrin, a Naturally Occurring Lignan, Is a Specific Probe Substrate of Human Cytochrome P450 3A. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(1):94–104.